

## 2型糖尿病状態が骨代謝に及ぼす影響の検討

著者	須田 覚
雑誌名	埼玉医科大学雑誌
巻	28
号	4
ページ	155-163
発行年	2001-10-25
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1386/00000461/">http://id.nii.ac.jp/1386/00000461/</a>



原 著

## 2型糖尿病状態が骨代謝に及ぼす影響の検討

須田 覚

## Influence of Type2 Diabetic States onto Bone Metabolism

Satoru Suda (Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Recent epidemiological surveys have revealed that diabetes is a risk factor for bone fracture. The mechanism for this presumably relates to the various factors associated with diabetics (e.g., insulin deficiency or resistance and/or continuous hyperglycemia). We, therefore, studied the effects of high glucose and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) on osteoblasts and osteoclasts; TNF $\alpha$  has been shown to be a key factor responsible for insulin resistance. High glucose concentrations (60 mM) did not affect alkaline phosphatase (ALP) activity in mouse primary osteoblasts (OBs), whereas TNF $\alpha$  decreased ALP activity. Treatment of OBs with TNF $\alpha$  showed an increased number of apoptotic cells. When mouse OBs and bone marrow cells were cultured in the presence of PGE<sub>2</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, osteoclasts (OCs) were formed under high glucose concentrations (5.6-60 mM), while TNF $\alpha$  inhibited OC formation in the co-cultures. When mature OCs were studied with respect to bone resorbing function, it was found that bone resorption was inhibited by exposure to high glucose (15-60 mM). TNF $\alpha$  also inhibited bone resorbing capacity. The effects of decreased bone resorption were, at least partly, due to the deranged actin ring formation of OCs. Although OC formation and function was modified, these agents did not influence the expression of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand and osteoprotegerin in OBs nor the expression of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B in OC progenitors. These results indicate that the functions of OBs and OCs could be modified to some extent by TNF $\alpha$ , together with high glucose. This study also supports our recent observation that rats with type 2 diabetes showed low turnover of bone, which resulted in deranged mechanical properties of bone.

**Keywords:** diabetes mellitus, insulin resistance, high glucose, tumor necrosis factor  $\alpha$

*J Saitama Med School 2001;28:155 - 163*

(Received July 5, 2001)

## 緒 言

1948年にAlbrightらが糖尿病の長期罹患患者に易骨折性が生じると報告して以来、糖尿病と骨代謝異常との関連性が検討されてきた。インスリン欠乏が特徴的である1型糖尿病では骨量減少が生じ、その結果骨折頻度が増加するという一定した見解が得られている<sup>1)</sup>。一方、本邦で糖尿病の大部分を占める2型糖尿病に関しては様々な臨床報告があり、骨量が大きく変化しない以上骨折の危険因子とはならないのではないかの指摘が多かった<sup>2-4)</sup>。しかし糖尿病においては持続的高血糖が骨基質蛋白の糖化(グリケーション)を促し、たとえ骨の量的変化を認めなくても質的な変化が起こり、その結果骨脆弱性がもたらされる可能性がある。実際我々の検討では2型糖尿病モデル(GK)

ラットでは血糖コントロール状況が易骨折性と強く相関しており、このことを支持する所見と考えられた<sup>5)</sup>。また糖尿病の骨量異常に関して報告が一定しない理由としては対象群の内因性インスリン分泌量、体型、治療方法、性、年齢、罹病期間、治療経過、合併症など様々な因子が関与していることも推測される。しかしごく最近、大規模臨床試験での結果を詳細に解析したところ、2型糖尿病も骨折の危険因子の一つであることが明らかとされ<sup>6)</sup>、糖尿病による易骨折性の病態解明に興味が持たれつつある。

2型糖尿病における高血糖状態ではインスリン抵抗性が引き起こされ、インスリン作用不足がもたらされることが病態形成に深く関与している。本病態でのインスリン抵抗性は肥満や高血糖をはじめとした代謝異常によりもたらされ、インスリン受容体のチロシンキナーゼ活性、自己リン酸化能が低下していることが示されている<sup>7)</sup>。また最近、肝臓・骨格筋といったイン

スリン抵抗性発現臓器に作用する因子として脂肪細胞から分泌される腫瘍壊死性因子 (tumor necrosis factor  $\alpha$ : TNF $\alpha$ ) が注目されている。TNF $\alpha$ はセリン・スレオニンキナーゼを介してインスリン受容体基質 (IRS) 蛋白をリン酸化し、インスリン受容体から細胞内への情報伝達を阻害したり、4型グルコース輸送担体 (GLUT4) の発現を低下させることが知られている<sup>8)</sup>。このようなインスリン抵抗性がもたらされる病態は、肝臓や骨格筋といったグルコースの出納に重要な役割を果たす臓器のみでなく、骨の代謝調節機構にも影響を及ぼすことが考えられる。特に骨が内包し造血を営む骨髓組織は脂肪細胞を多く含み、加齢と共にその量が増大することが知られている。脂肪細胞はTNF $\alpha$ を分泌することが知られており、脂肪腫化とともに骨髓脂肪細胞が分泌するTNF $\alpha$ は増加すると考えられ、パラクラインのメカニズムで近傍の骨芽細胞、骨髓細胞に影響することも予想される。本研究では、糖尿病での骨代謝異常に関与すると思われる高グルコース環境とともに、2型糖尿病でのインスリン抵抗性の病態に関与するインスリン・TNF $\alpha$ が骨代謝の中心を担う骨芽細胞・破骨細胞の増殖や分化に対し及ぼす影響について検討した。

## 材料及び方法

### 動物及び材料

生後1日齢及び5週齢(雄性) ddyマウスは日本クレーアより購入した。培養液は10%胎児ウシ血清(FCS, 第一化学薬品), ペニシリン 100 IU/ml, ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/mlを含む $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, Sigma, St. Louis, MO)を使用した。phosphate buffered saline (PBS), 0.25%トリプシン-EDTA, D-グルコース, L-グルコース, マンニトール, インスリン, マウスTNF $\alpha$ , naphthol AS-MX phosphate, fast red violet LB saltはSigmaより購入した。Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) はCayman Chemical Company (Ann Arbor, MI), 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] はBiomol Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA), サケカルシトニン (sCT) はBachem (Torrance, CA), 1型コラーゲンゲル (Cell matrix type 1-A) は新田ゼラチン(大阪), コラゲナーゼは和光純薬(大阪)より購入した。

### 新生児マウス頭蓋骨からの骨芽細胞の分離

マウス骨芽細胞は既報<sup>9,12)</sup>に基づき、1日齢ddyマウスの頭頂骨を採取、0.1%コラゲナーゼ及び0.2%ディスパーゼ(合同酒精, 東京)処理し、得られた細胞(primary osteoblast: POB)を使用した。24穴プレート, 10 cmディッシュにて10% FCSを含む $\alpha$ -MEMで37°C, 5% CO<sub>2</sub>存在下に培養した。実験には1-5継代の細胞を使用した。

### Alkaline phosphatase (ALP) 活性の測定

24穴プレートにPOBを $2.5 \times 10^4$  cells/wellで播種し、D-グルコース (15-60 mM), L-グルコース (15-60 mM), マンニトール (15-60 mM), インスリン  $10^{-7}$  M, TNF $\alpha$  (0.33-30 ng/ml) を添加してPOBにおけるALP活性の変化を確認した。ALP活性は培養液を除去した後、細胞をPBSで2度洗浄し超音波破碎し、Lowry法により測定した。またBio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) にて含有タンパク量を測定し単位蛋白量あたりの活性値として表示した。

### RNAの抽出

10 cmディッシュにPOBまたは骨髓細胞を $5 \times 10^6$  cell/dishで播種し、ほぼコンフルエントに達した後に各種因子 (D-グルコース 60 mM, L-グルコース 60 mM, マンニトール 60 mM, インスリン  $10^{-7}$  M, TNF $\alpha$  30 ng/ml) を添加した。0-48時間後、上清を除去しPBSで2回洗浄、既報<sup>13)</sup>のacid guanidinium-phenol-chloroform法にてtotal RNAを抽出した。

### RT-PCRによるRNAの増幅

上述の如く細胞より抽出したRNAを用いたcDNAへのreverse transcription (RT)は、1.0  $\mu$ gのtotal RNAとともに2.5  $\mu$ U/ $\mu$ lのreverse transcriptase, 2.5  $\mu$ Mのrandom hexamer, 1.0 mMのdNTP mixを42°Cで1時間インキュベートして行った。本反応液の2  $\mu$ lを用いて標的分子に特異的にデザインされたプライマーを用いてPCRを実施した。プライマーにはPOB上のreceptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) ligandの発現をみるためsense 5'-CAGCACTCACTGCTTTATAGAATCC-3'とanti-sense 5'-AGCTGAAGATAGTCTGTAGGTACGC-3'を、またosteoprotegerin (OPG)にはsense 5'-ATGCAACACATGACAACGTG-3'とanti-sense 5'-GGAACCTCATGGTCTTCCTC-3'を用いた。破骨細胞前駆細胞に発現するRANKの発現の解析にはsense 5'-AAGATGGTTCCAGAAGACGGT-3'とanti-sense 5'-CAGATAGTCAGTTCTGCTCGGA-3'を用い、コントロールとしてglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現を評価するためsense 5'-CATGGAGAAGGCTGGGGCTC-3', anti-sense 5'-AACGGATACATTGGGGGTAG-3'を用いた。RNAの増幅はPCR thermal cycler (宝酒造バイオ, 東京)を使用した。PCRの条件はプレヒート94°C 5分、変性94°C 30秒、アニーリング55°C 30秒、伸長68°C 45秒としサイクル数は30回転を用いた。PCR産物は1.5%アガロースゲルにて電気泳動後エチデウムブロマイド染色を施し、UV撮影にて記録した。画像解析システム (NIH image version 1.61)を用いてシグナル強度を評価し発現量を比較した。各プライマーはAmersham Pharmacia Biotech UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)より購入した。

### アポトーシスの検出

チャンバースライド (Nunc, Naperville, IL) 上にPOB

( $1 \times 10^4$  cells/well) を播種した後、各種因子 (D-グルコース 60 mM, マンニトール 60 mM, インスリン  $10^{-7}$  M, TNF $\alpha$  30 ng/ml) で刺激し 0-48 時間後 bisbenzimidazole H 33342 fluorochrome, trihydrochloride (Calbiochem, La Jolla, CA) により核の蛍光染色を施し、形態学的変化を蛍光顕微鏡 (Zeiss, Germany) 下で観察した。また、POB と破骨細胞前駆細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/dish) を 10 cm ディッシュに播種、コンフルエントに達する前にメディウムを 0.1% BSA (ウシ血清アルブミン, 和光純薬) を含有する  $\alpha$ -MEM へ変更、各種因子を添加し 24 時間培養した。0.25% トリプシンに 2% BSA を添加し接着細胞を上清中の浮遊細胞とともに回収した。PBS で洗浄後、アネキシン V-FITC 溶液とヨウ化プロピジウム溶液 (アネキシン V-フルオレセイン染色キット, 和光純薬) を加え蛍光染色し、FACS Calibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA) にて蛍光強度を測定、Cell Quest (version 3.1) を用いて解析した。

#### 成熟破骨細胞形成

既報のごとく<sup>9,11)</sup>、マウス破骨細胞は 5 週齢 ddy マウスの長幹骨より採取した骨髓細胞 ( $6 \times 10^5$  cells/dish) と POB ( $5 \times 10^5$  cells/dish) を 10% FCS を含む  $\alpha$ -MEM, PGE<sub>2</sub>  $10^{-7}$  M, 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>  $10^{-8}$  M を加え 1 型コラーゲンゲル上で 7-8 日間共存培養し作成した。光学顕微鏡において形成された多核巨細胞を確認し、1 型コラーゲンゲルを 0.2% コラゲナーゼで溶解、細胞を回収し実験に供した。

#### 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色

形成された多核巨細胞が破骨細胞であることを確認するため、既報の方法<sup>12)</sup> に準じて TRAP 染色を行った。50 mM sodium acetate buffer, 40 mM potassium sodium tartrate buffer (pH 5.0), 0.01 % naphthol AS-MX phosphate, 0.03 % fast red violet LB salt で細胞を 20 分間染色した。染色液除去後、蒸留水で洗浄し光学顕微鏡 (Olympus CK40) 下に TRAP 陽性の多核細胞を観察した。

#### 破骨細胞形成に及ぼす影響の検討

24 穴プレートに骨髓細胞 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) と POB ( $2.5 \times 10^4$  cells/well) を播種し D-グルコース (5.6-60 mM), L-グルコース (30-60 mM), マンニトール (30-60 mM), インスリン ( $10^{-7}$  M), TNF $\alpha$  (30 ng/ml) の存在下に 7-8 日間共存培養し、破骨細胞形成に対して各種因子が及ぼす影響を評価した。

#### 破骨細胞による骨吸収能の評価

骨吸収は既報<sup>10,11)</sup> に従い、1 型コラーゲンゲル上で作製した成熟破骨細胞を回収し、象牙切片 (直径 5 mm, 厚さ  $\sim 50 \mu\text{m}$ ) 上に播種し、2-3 時間後 D-グルコース (30-60 mM), マンニトール (30-60 mM), インスリン ( $10^{-7}$  M), TNF $\alpha$  (0.33-30 ng/ml) を添加した。48 時間培養後メディウムを除去し PBS にて洗浄、1.0 N NH<sub>4</sub>OH 存在下に超音波処理し表層の細胞を

除去した後、マイヤーヘマトキシリン染色液 (和光純薬) にて染色した。蒸留水にて洗浄後、顕微鏡下に骨吸収窩を観察した。象牙切片上に形成された骨吸収窩数および面積を画像解析システム (NIH image) を用いて計測した<sup>13)</sup>。

#### アクチンリング形成能の評価

コラーゲンゲル上で作製した成熟破骨細胞を回収しチャンバースライド上に播種、D-グルコース 60 mM, マンニトール 60 mM, TNF $\alpha$  30 ng/ml で刺激し 6-24 時間後 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて細胞を固定、PBS で洗浄後 0.1% Triton X-100 (Research Organics Inc., Cleveland, Ohio) にて処理した。ローダミンファロイジン染色液 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon) を加え約 10 分染色し PBS にて洗浄、蛍光顕微鏡 (Zeiss, Germany) にてアクチンリングを観察した。

#### 統計学的処理

測定結果は全て mean  $\pm$  standard deviation により示し、統計学的処理は分散分析を実施した後に Sheffe の検定を用いて  $p < 0.01$  を有意差ありと評価した。

## 結 果

#### グルコース、インスリンおよび TNF $\alpha$ が骨芽細胞系細胞の ALP 活性に及ぼす影響の検討

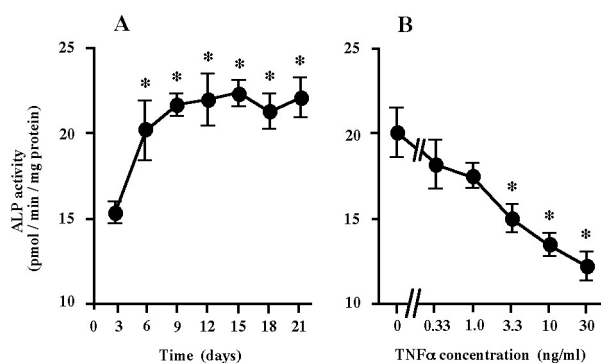
高グルコース環境は骨芽細胞系細胞を含めていくつかの細胞系で細胞内情報伝達を阻害する可能性が示されている<sup>14)</sup>。まず持続的高グルコース環境あるいは高インスリン環境が骨芽細胞 ALP 活性に及ぼす影響を POB を用いて検討した。Fig. 1A に示すように培養期間と ALP 活性を検討したところ、培養 9-21 日の間は ALP 活性がほぼ一定しておりこの期間での評価が適切と考えた。各種濃度のグルコース含有培養液およびインスリン環境で 10 日間培養し ALP 活性を評価したところ、Table. 1 に示すように 60 mM の高濃度グルコース環境や浸透圧コントロールのマンニトール処理は 10 日間の処理で大きな影響を与えなかった。またインスリン  $10^{-7}$  M による処理も ALP 活性に影響を与えなかった。

2 型糖尿病でインスリン抵抗性に関与するとされる TNF $\alpha$  が、骨芽細胞の ALP 活性に与える影響を検討したところ、Fig. 1B に示すように培養液中への TNF $\alpha$  の添加は用量依存性に POB の ALP 活性を低下させ、その効果は 3.3 ng/ml 以上より高濃度で有意 ( $p < 0.01$ ) であった。

#### グルコース、インスリンおよび TNF $\alpha$ が骨芽細胞系細胞のアポトーシスに与える影響

高グルコース環境はいくつかの細胞系でアポトーシスを促すことが報告されている。そこで我々は高グルコース環境、インスリン、TNF $\alpha$  が POB のアポトーシスに及ぼす影響を検討した。POB をグルコース、イ





**Fig. 1.** Time course and effects of TNF  $\alpha$  on ALP activity in mouse POBs. (A) Time course of ALP activity in POBs. POBs were cultured for the times indicated and ALP activity in the cells was measured, as described in Materials and Methods. (B) Effects of TNF  $\alpha$  on ALP activity in POBs. POBs were cultured for 5 days in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS. The media were then replaced with fresh media containing various concentrations of TNF  $\alpha$  and incubation continued for a further 5 days. ALP activity in the cells was measured as described in Materials and Methods. Each point represents the mean  $\pm$  SD for six wells. \* $p$  < 0.01 vs control cells.

**Table 1.** Effects of D- or L-glucose and mannitol on ALP activity in mouse primary osteoblasts

	ALP activity (pmol / min / mg protein)			
	concentrations (mM)			
	5.6	15	30	60
<b>D-glucose</b>	20.9 $\pm$ 0.9	20.4 $\pm$ 0.5	21.0 $\pm$ 1.1	21.9 $\pm$ 0.6
<b>L-glucose</b>		22.4 $\pm$ 0.8	21.9 $\pm$ 0.8	21.2 $\pm$ 0.7
<b>Mannitol</b>		22.1 $\pm$ 8.5	22.3 $\pm$ 1.7	21.7 $\pm$ 1.4

Primary osteoblasts were prepared from newborn calvaria. Osteoblasts were cultured with D- and L-glucose as well as mannitol for 10 days. Cells were sonicated and ALP activity was measured as described in Materials and Methods.

Insulin  $10^{-7}$  M, TNF  $\alpha$  30 ng/mlで刺激し 24 時間処理した後、アポトーシスを生じた細胞をHoechst 33342を用いた核の蛍光染色で評価した。グルコース 60 mM, マンニトール 60 mMによる処理はグルコース 5.6 mM (コントロール) と差を認めなかったが, TNF  $\alpha$

処理群は著明な核の断片化を誘導した (Fig. 2B). またアポトーシス細胞をアネキシン V, ヨウ化プロピジウムを用いた 2 重染色を行いフローサイトメトリーで  $1 \times 10^4$  個の細胞を測定したところ, Fig. 3 に示すようにマンニトール 60 mM (A), グルコース 60 mM (B) での POB におけるアポトーシス細胞は 12% 前後でコントロールと同等であったが, TNF  $\alpha$  30 ng/ml 処理群では約 24% まで増加した (C).

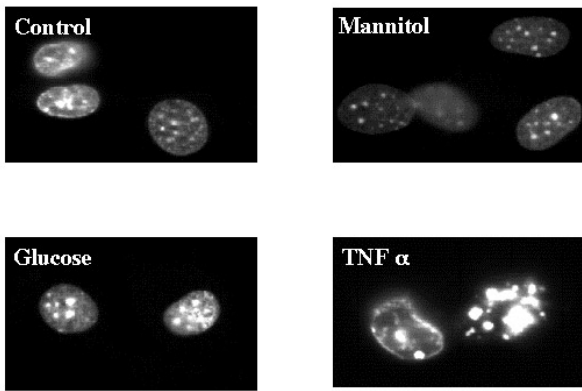
#### グルコース, インスリンおよび TNF $\alpha$ が破骨細胞形成に及ぼす影響の検討

糖尿病における骨代謝異常に関して, 骨吸収を営む破骨細胞の役割は十分に検討されていない. そこで我々はマウス破骨細胞形成系を用いてグルコースとインスリンの作用を検討した. 一日齢のマウス頭蓋骨から得た骨芽細胞と 5 週齢の雄性マウスより得られた骨髓細胞を PGE<sub>2</sub>  $10^{-7}$  M, 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>  $10^{-8}$  M の存在下に約 7 日間培養し成熟破骨細胞を誘導した. Table. 2 に示すように, 高濃度 (60 mM) の D-グルコース, L-グルコース, マンニトールの存在下にも破骨細胞は形成され, それらの濃度の変化 (5.6–60 mM) は破骨細胞形成に対し影響をもたらさなかった.

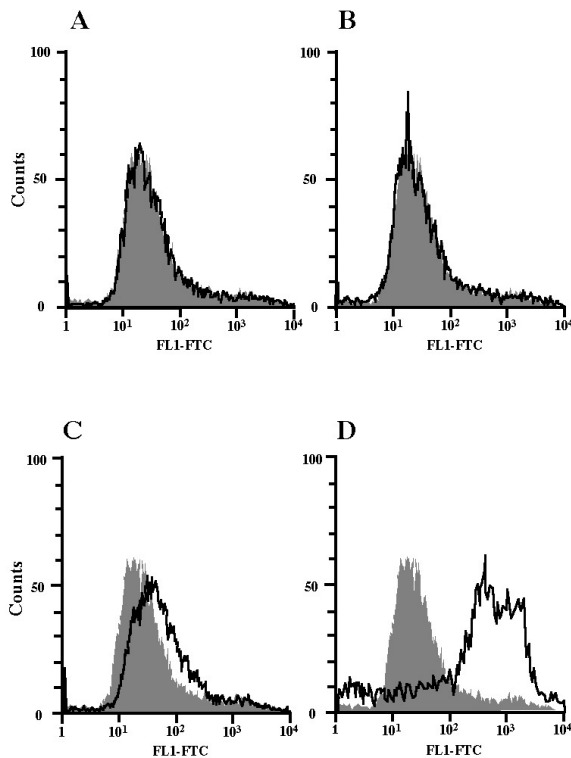
共存培養系では PGE<sub>2</sub> が成熟破骨細胞の分化を導き, 培養 7 日目に多核の破骨細胞数が最大となる. 本実験系に TNF  $\alpha$  単独処理および PGE<sub>2</sub> との共存下における破骨細胞形成能の変化を調べた. TNF  $\alpha$  単独でも破骨細胞形成は認められたが, その効果は PGE<sub>2</sub> と比べると弱く, PGE<sub>2</sub> と TNF  $\alpha$  による処理では 7 日目の多核破骨細胞数は PGE<sub>2</sub> 単独群に比し有意に少なかった. マウス TNF  $\alpha$  は, TNF1 型受容体 (TNFR 1: p55) と 2 型受容体 (TNFR 2: p75) の 2 つの受容体に作用し, 多くの作用は TNFR 1 を介する. TNFR 1 からのシグナルは TRADD (TNFR associated death domain protein) と FADD (Fas-associated protein with a novel death domain) を介しカスパーゼを活性化しアポトーシスを誘導するシグナルと, TRAF 2 を経て MAP キナーゼ経路を活性化することで I $\kappa$ B のリン酸化・分解を経て NF- $\kappa$ B を活性化し破骨細胞への分化を促す経路に分かれる. Fig. 4 に示した PGE<sub>2</sub> の破骨細胞形成を減弱するという TNF  $\alpha$  の効果は, 抗マウス TNFR 1 抗体 (Anti-TNFR p55, Genzyme, Cambridge, MA) の添加により改善した. この改善効果は, 骨芽細胞でのアポトーシスシグナルを減弱したことが関与すると考えられた.

#### グルコース, インスリンおよび TNF $\alpha$ が破骨細胞分化誘導因子とその関連蛋白の発現に及ぼす影響の検討

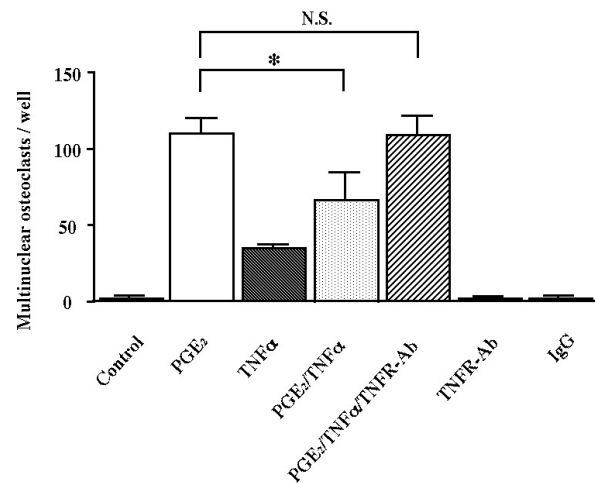
骨芽細胞は細胞膜上に receptor activator for NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) を発現し, 破骨細胞前駆細胞の RANK (RANKL 受容体) に作用し, 多核化をもたらす成熟破骨細胞へと分化を導く. 本実験で認められた TNF  $\alpha$  での破骨細胞形成の抑制が RANKL あるいは RANK の発



**Fig. 2.** Effects of mannitol, glucose and  $\text{TNF } \alpha$  on DNA fragmentation of mouse POBs. POBs were incubated with mannitol (60 mM), glucose (60 mM) and  $\text{TNF } \alpha$  (30 ng/ml) for 24 h. Cells were stained by bisbenzimidazole H 33342 fluorochrome trihydrochloride and morphological changes of nuclei were observed as described in Materials and Methods. Representative nuclear patterns are shown.



**Fig. 3.** Effects of mannitol, glucose and  $\text{TNF } \alpha$  on early apoptosis in mouse POBs. Subconfluent cells were treated with mannitol (60 mM), glucose (60 mM) and  $\text{TNF } \alpha$  (30 ng/ml) in  $\alpha$ -MEM containing 0.1% BSA for 24 h. Adherent cells were collected after trypsinization and washed twice with PBS carefully. Cells were stained for Annexin V and with propidium iodide and the number of apoptotic POBs was studied by flow cytometric analysis as described in Materials and Methods. The proportion of apoptotic cells were 10.9% in control cells (0.1% BSA); 12.5% in cells treated with 60 mM mannitol (A); 12.6% in cells treated with 60 mM glucose (B); 23.7% in cells treated with 30 ng/ml  $\text{TNF } \alpha$  (C); 37.3% in cells treated with UV light for 5min (D).



**Fig. 4.** Effects of  $\text{TNF } \alpha$  and  $\text{PGE}_2$  on mouse osteoclast formation. Mouse POBs prepared from newborn mouse calvaria and bone marrow cells were co-cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS with or without  $\text{PGE}_2$  ( $10^{-7}$  M) and  $\text{TNF } \alpha$  (30 ng/ml) for 7 days. Anti-mouse p55  $\text{TNF}$  receptor antibody (10  $\mu\text{g/ml}$ ) and control IgG (10  $\mu\text{g/ml}$ ) were added to culture media from day 0. The number of TRAP-positive multinuclear cells were counted and are shown as the mean  $\pm$  SD for four wells. \* $p < 0.01$ .

**Table 2.** Effects of D- or, L-glucose and mannitol on multinuclear osteoclast formation

	Multinuclear osteoclasts / well		
	concentration (mM)		
	5.6	30	60
D-glucose	175.4 $\pm$ 19.4	196.0 $\pm$ 19.9	198.4 $\pm$ 31.0
L-glucose		164.0 $\pm$ 24.8	162.8 $\pm$ 27.1
Mannitol		166.8 $\pm$ 22.2	167.8 $\pm$ 23.0

Primary osteoblastic cells prepared from newborn mouse calvaria and bone marrow cells from male mice were co-cultured on 24-well plate in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS in the presence of  $10^{-8}$  M  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  for 7 days. D- and L-glucose as well as mannitol were added to the media from the beginning of the co-culture. On day 7, the number of multinuclear cells staining positive for TRAP was determined.

現の変化によるか否かを明らかにするため、POBにおけるRANKLと破骨細胞前駆細胞におけるRANK発現への影響を検討するとともに、RANKLのおとり受容体 (decoy receptor) である osteoprotegerin (OPG) の発現をRT-PCR法で検討した。Fig. 5に示すようにTNF  $\alpha$  でPOBを処理してもRANKL, OPGのmRNA発現には大きな影響をもたらさなかった。また、破骨細胞前駆細胞をTNF  $\alpha$  処理してもRANKの発現レベルには影響を及ぼさなかった (Fig. 6)。

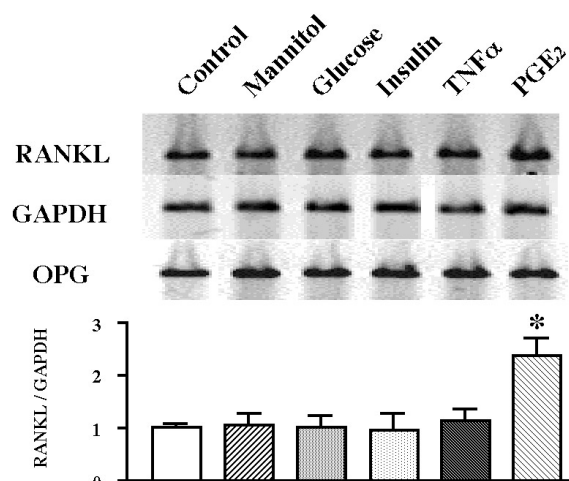
#### グルコース、インスリンおよびTNF $\alpha$ が骨吸収能に及ぼす影響の検討

破骨細胞の骨吸収能に及ぼす持続的高グルコース環境あるいはインスリンの影響を象牙切片上の骨吸収面積およびアクチンリング形成で検討した。骨吸収能はマンニトール 60 mMによる処理でも影響を受けず骨吸収窩を形成したが、高濃度 (30–60 mM) のグルコース処理は濃度依存的に骨吸収能を抑制した (Fig. 7A)。またTNF $\alpha$ で処理した場合、0.33 ng/ml以上の濃度で有意な骨吸収能の低下をもたらした (Fig. 7B)。

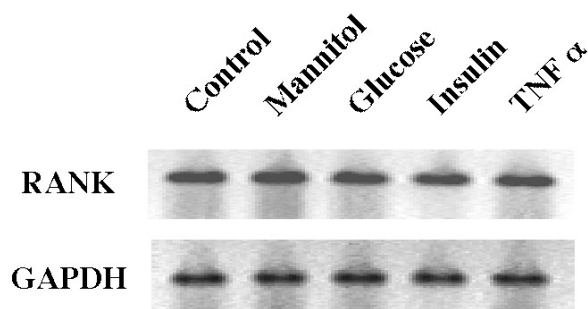
成熟破骨細胞をチャンバースライド上に播種し各種因子で6–24時間刺激した後固定し、ロダミン・ファロイジンで染色し蛍光顕微鏡下でアクチンリングの形成状態を観察した。アクチンリングが完全に残存している破骨細胞 (Fig. 8A) とアクチンリングが破綻している破骨細胞 (Fig. 8B) 数をそれぞれ計測し、アクチンリング形成率として評価した。マンニトール 60 mMで24時間処理してもコントロールと同程度のアクチンリング形成率を認めた。TNF $\alpha$  30 ng/mlおよび高濃度グルコース (60 mM) ではそれぞれ有意にアクチンリング形成が阻害された (Fig. 8C)。グルコース、TNF $\alpha$ 添加群とも高濃度であるほど全周性に形成されているアクチンリングの数は減少していた。

#### 考 察

従来糖尿病あるいは糖代謝異常が骨代謝調節機構に様々な形で影響を及ぼすことが*in vitro*および*in vivo*で示されてきた。その結果、インスリン作用不足が骨芽細胞機能を低下させ、高グルコース環境の持続が細胞内代謝調節系に大きく影響する可能性などが提唱されてきた<sup>15)</sup>。しかしながら持続的高血糖がもたらされる2型糖尿病では、単に骨のミネラル量だけではない骨の質的变化も易骨折性に関与するのではないかと推測される。例えばKatayamaらはストレプトゾトシンで膵 $\beta$ 細胞を破壊した1型の糖尿病モデルラットの骨中にadvanced glycation end productsが増加し骨芽細胞の機能が障害されることを明らかにし<sup>16)</sup>、また最近我々は2型糖尿病モデルラットであるGKラットで、高血糖の持続期間と骨強度の減少が有意に相関することを認めている<sup>5)</sup>。糖尿病は様々な要因

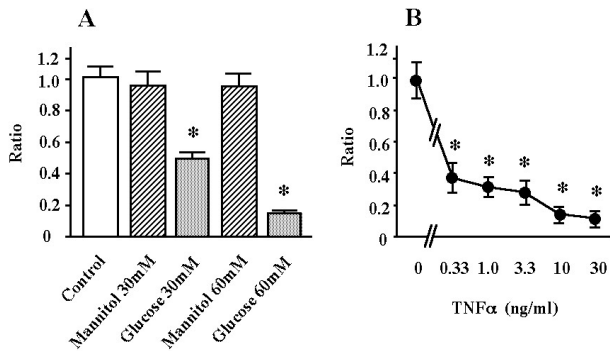


**Fig. 5.** Effects of mannitol, glucose, insulin, TNF  $\alpha$ , and PGE<sub>2</sub> on RANKL and OPG mRNA expression in mouse POBs. POBs were treated with mannitol (60 mM), glucose (60 mM), insulin ( $10^{-7}$  M), TNF $\alpha$  (30 ng/ml) and PGE<sub>2</sub> ( $10^{-7}$  M) in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS for 24 h. Total RNA was extracted from the cells. RNA was reverse transcribed and subjected to 30 cycles of PCR for RANKL and OPG mRNA amplification and 30 cycles for GAPDH mRNA amplification using specific primers, as described in Materials and Methods. Representative signals of PCR products are shown.

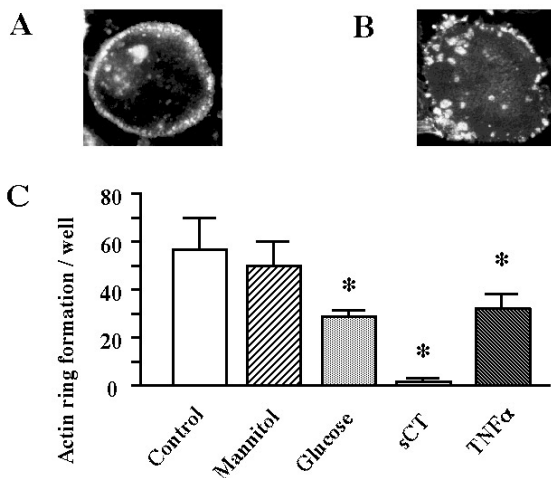


**Fig. 6.** Effects of mannitol, glucose, insulin and TNF  $\alpha$  on RANK mRNA expression in M-CSF dependent osteoclast precursors. Mouse bone marrow cells were cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS and M-CSF (100 ng/ml). M-CSF dependent osteoclast precursors were subcultured and treated with mannitol (60 mM), glucose (60 mM), insulin ( $10^{-7}$  M) and TNF $\alpha$  (30 ng/ml) in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS for 24 h. Total RNA was extracted from the cells. RNA was reverse transcribed and subjected to 28 cycles of PCR for RANK mRNA amplification and 28 cycles for GAPDH mRNA amplification using specific primers, as described in Materials and Methods. Representative signals of PCR products were shown in this figure.





**Fig. 7.** Effects of mannitol, glucose (A) and  $\text{TNF}\alpha$  (B) on pit formation. Mature mouse osteoclasts were prepared from co-cultures of newborn mouse calvaria and bone marrow cells. Cells were co-cultured on type I collagen gels in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS in the presence of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $10^{-8}$  M) and  $\text{PGE}_2$  ( $10^{-7}$  M) for 7 days. Cells were gently collected from the collagen-coated dishes after treatment with 0.2% collagenase for 10 min. Equal numbers of osteoclasts were settled onto dentine slices. The OCs were then treated with mannitol and glucose (A), and various concentrations of  $\text{TNF}\alpha$  (B) for 48 h. The area of bone resorbed was quantitated, as described in Materials and Methods. Each point represents the mean  $\pm$  SD for four dentine slices.  $P < 0.01$  vs. control cells.



**Fig. 8.** Effects of mannitol, glucose, salmon calcitonin (sCT) and  $\text{TNF}\alpha$  on actin ring formation in osteoclasts. Mature mouse osteoclasts were prepared from co-cultures of newborn mouse calvaria and bone marrow cells. Cells were co-cultured on type I collagen gels in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS in the presence of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $10^{-8}$  M) and  $\text{PGE}_2$  ( $10^{-7}$  M) for 7 days. Cells on the collagen-coated dishes were treated with 0.2% collagenase for 10 min and gently collected. Mature osteoclasts were inoculated into chamber slides. Cells were treated with mannitol (60 mM), glucose (60 mM), sCT ( $10^{-9}$  M) and  $\text{TNF}\alpha$  (30 ng/ml) for 24h. Cells were stained by rhodamine-conjugated phalloidin for 15min at room temperature. Actin ring formation was analyzed by counting cells with complete (A) and incomplete (B) ring structures.

が病態形成に寄与しているが、インスリン抵抗性が強く関与する2型糖尿病では脂肪細胞から分泌され局所で作用する $\text{TNF}\alpha$ が病態に影響をもたらす可能性も考えられている。特に骨においては加齢と共にその内部組織である骨髄の脂肪化が起こり、インスリン抵抗性の状態では骨髄脂肪細胞からの $\text{TNF}\alpha$ の産生が増大しやすく病態形成に寄与する可能性も推測される。

Inabaらは骨芽細胞様細胞(MG-63)を高糖濃度下で培養すると $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、IGF-1に対する応答性の低下、オステオカルシンの産生減少を生じ、この反応の一部はアルドース還元酵素阻害剤の添加により回復したと報告している<sup>17)</sup>。しかし我々の検討では骨芽細胞を60 mMまでの高濃度グルコースに暴露しても骨芽細胞のALP活性、共存培養系での破骨細胞形成支持能には影響を及ぼさなかった。我々の結果は短期間の高血糖への暴露自体が骨芽細胞に対して細胞障害性をもたらすというよりは、糖尿病に伴う他の病態(インスリン作用不足、慢性の高血糖環境による組織のグリケーションなど)が糖尿病での骨脆弱性に関与する可能性を示している。

Kitajimaらはhuman T cell leukemia virus type 1 (HTLV1) 感染細胞(MT2)をマウス骨芽細胞系細胞(MC3T3E1)とともに培養すると、MC3T3E1細胞にアポトーシスが誘導されることを報告し、この効果が $\text{TNF}\alpha$ の中和抗体により抑制されること、また $\text{TNF}\alpha$ を投与するとMC3T3E1細胞にアポトーシスが誘導されることを示した<sup>18)</sup>。本研究でもPOBを $\text{TNF}\alpha$ で処理するとALP活性が抑制されると共に、骨芽細胞にアポトーシスが誘導されることが判明した。これらの結果は $\text{TNF}\alpha$ が骨芽細胞に対して作用し、骨形成を抑制する方向に作用する可能性を示す成績と思われる。

骨芽細胞による破骨細胞形成支持はSudaらが提唱しているように<sup>19)</sup>、骨芽細胞表面に発現し破骨細胞前駆細胞に作用する分子が介在することが示された<sup>20)</sup>。骨芽細胞系ストローマ細胞で見出された破骨細胞分化誘導因子は既報のRANKのリガンドとして作用することがわかり、またモノサイト・マクロファージ系細胞の破骨細胞前駆細胞には、RANKと呼ばれる $\text{TNF}$ 受容体ファミリーに属する膜結合受容体が発現していることが判明した。そして従来から骨吸収を促進することが知られていた活性型ビタミンD ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )、副甲状腺ホルモン(PTH)、 $\text{PGE}_2$ などはいずれもこのRANKLの遺伝子発現を増大させる。一方、Kobayashiらは $\text{TNF}\alpha$ が破骨細胞前駆細胞に直接作用して破骨細胞の形成を促進する新たな破骨細胞分化経路があることをRANKノックアウトマウスを用いて証明し、慢性関節リウマチなどの病的な関節破壊に本経路が関与する可能性を示した<sup>21)</sup>。しかしながら生体内での通常の骨代謝回転では、破骨細胞の分化はホルモンやサイ



トカインなどを介して骨芽細胞の支持能に応じて調整されている。骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞がともに存在する共存培養系は*in vivo*での状況をより総合的に評価できる系と思われる。TNF $\alpha$ によるTNFR 1からのシグナルはTRAF 2を経てその下流に存在するMAPキナーゼ経路<sup>22-24)</sup>を活性化、I $\kappa$ Bのリン酸化・分解を経てNF- $\kappa$ Bを活性化し破骨細胞への分化を促す。このTNF $\alpha$ による破骨細胞形成にはTNFR 1とTNFR 2の両方からのシグナルが重要である<sup>21)</sup>。今回の我々の検討でもTNF $\alpha$ は破骨細胞前駆細胞に直接作用し破骨細胞形成を促すが (Fig. 5)、骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系にTNF $\alpha$ を加えると、むしろPGE<sub>2</sub>など骨芽細胞を介して破骨細胞形成に作用する効果を減弱させた。この作用はTNFR 1からTRADDとFADDを介したシグナルが、カスパーゼ8を活性化し骨芽細胞にアポトーシスを導いたと考えられた。破骨細胞前駆細胞にTNF $\alpha$ が作用し破骨細胞の形成や生存を促進するという報告がなされているが、我々の検討では骨芽細胞に対してもTNF $\alpha$ は作用し、破骨細胞の支持能を低下させるという結果を得た。しかしTNF $\alpha$ はRANKL、OPGの発現を変化させなかったことからRANK-RANKL系を介さない経路の関与や、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) や接着因子など他の破骨細胞支持因子への関与も推測され、今後はシグナル伝達に関する解析を含めさらに検討する必要がある。

破骨細胞による骨吸収は、1. 破骨細胞が発現する骨基質蛋白のオステオポンチンが骨表面に強固に接着し辺縁にアクチンリングによる明帯を構築し吸収窩を形成し、2. 骨吸収面に形成される波状縁の細胞膜に存在するH<sup>+</sup>ポンプ (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) よりH<sup>+</sup>が分泌されミネラルの溶解がもたらされ、3. 蛋白水解酵素 (リソソーム酵素、カテプシンK) の活性化が起こり、有機基質の分解を促進することで生じる<sup>19)</sup>。生体内の細胞の中で骨吸収を営むことができるのは破骨細胞のみであり、高度に統合された機能のどの段階が破綻しても骨吸収能の低下として観察される。今回、成熟破骨細胞を用いて骨吸収能に及ぼす高濃度グルコースとTNF $\alpha$ の影響を見たところ、高濃度グルコース環境への暴露とTNF $\alpha$ による刺激は、骨吸収を抑制した。破骨細胞のアクチンリング形成が影響を受けるか否かを検討したところ、Fig. 8Cに示すようにTNF $\alpha$ による刺激や高濃度グルコース処理において、全周性のアクチンリングを形成した細胞は減少していた。高濃度グルコースによりもたらされた骨吸収能抑制は、少なくとも一部は破骨細胞の機能が直接障害されアクチンリングの破綻が関与したと考えられ、またTNF $\alpha$ の効果は骨芽細胞の支持能の変化が関与していると想定されるが、今後はその機構のさらなる解析が必要と考えられる。また今後、グルコースとTNF $\alpha$ の相互作用に関する検討を進めることが必要と判断される。

## 結 論

今回の*in vitro*での研究結果は、インスリン抵抗性の病態で存在する高濃度グルコースやTNF $\alpha$ が骨芽細胞と破骨細胞の機能を様々に修飾し、骨形成と骨吸収を抑制する可能性を示している。*in vivo*での2型糖尿病モデルラットを用いた研究では、糖尿病において低代謝回転の骨代謝を導く可能性が示されており、今回の*in vitro*での成績はそれらの研究結果を細胞レベルで支持する成績と考えられた。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご指導およびご鞭撻を賜りました埼玉医科大学第4内科学教室片山茂裕教授、飯高誠助教授、和田誠基講師、北濱眞司講師、長谷啓子実験助手、並びに教室員各位に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Hui SL, Epstein S, Johnston CC. A prospective study of bone mass in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:74-80.
- 2) Kelsey JL, Browner WS, Seeley DG, Nevitt MC, Cummings SR. Risk factor for fractures of the distal forearm and proximal humerus. *Am J Epidemiol* 1992;135:477-89.
- 3) Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995;44:775-82.
- 4) Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1196-200.
- 5) 須田 覚, 和田誠基, 石井主税, 北濱眞司, 安田重光, 飯高 誠, 他. 2型糖尿病モデルラット (GK ラット) における持続的高血糖が骨強度へ及ぼす効果. *Diabetes Frontier* 2000;11:584-5.
- 6) Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, Schreiner PJ, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:32-8.
- 7) Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-8.
- 8) Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase.

- J Biol Chem 1996;271:13018-22.
- 9) Wada S, Akatsu T, Tamura T, Takahashi N, Suda T, Nagata N. Glucocorticoid regulation of calcitonin receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. J Bone Miner Res 1994;11:1705-12.
- 10) Wada S, Udagawa N, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM. Physiological levels of calcitonin regulate the mouse osteoclast calcitonin receptor by a protein kinase A-mediated mechanism. Endocrinology 1996;137:312-20.
- 11) Wada S, Udagawa N, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM. Calcitonin receptor down-regulation relates to calcitonin resistance in mature mouse osteoclasts. Endocrinology 1996;137:1042-8.
- 12) Wada S, Udagawa N, Akatsu T, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM. Regulation by calcitonin and glucocorticoids of calcitonin receptor gene expression in mouse osteoclast. Endocrinology 1997;138:521-9.
- 13) Wada S, Yasuda S, Nagai T, Maeda T, Kitahama S, Suda S, et al. Regulation of calcitonin receptor by glucocorticoid in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor. Endocrinology 2001;142:1471-8.
- 14) Williams B, Schrier RW. Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. Diabetes 1992;41:1464-72.
- 15) Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, et al. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. Bone 1998;22:17-23.
- 16) Katayama Y, Akatsu T, Yamamoto M, Kugai N, Nagata N. Role of nonenzymatic glycosylation of type 1 collagen in diabetic osteopenia. J Bone Miner Res 1996;11:931-7.
- 17) Inaba M, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. Importance of sustained high glucose condition in the development of diabetic osteopenia: Possible involvement of the polyol pathway. Osteoporos Int 1997;7:S209-12.
- 18) Kitajima I, Nakajima T, Imamura T, Takasaki I, Kawahara K, Okano T, et al. Induction of apoptosis in murine clonal osteoblast expressed by human T-cell leukemia virus type 1 tax by NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ . J Bone Miner Res 1996;11:200-10.
- 19) Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev 1992;13:66-80.
- 20) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/TRANSC/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3597-602.
- 21) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotate S, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med 2000;191:275-85.
- 22) Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, Kyriakis JM. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) and p38. J Biol Chem 1998;273:22681-92.
- 23) Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. Genes Dev 1999;13:1297-308.
- 24) Liu H, Nishitoh H, Ichijo H, Kyriakis JM. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. Mol Cell Biol 2000;20:2198-208.